

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. Erich Müller

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ESTERASE-AKTIVITÄT DER GEFÄßINTIMA
IM BEREICHE ARTERIOSKLEROTISCHER HERDE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

Vorgelegt von
Walter Josef Neumann
aus Heinersdorf a.T.

Dekan: Professor Dr. Fritz Heim

Referent: Professor Dr. Erich Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 1959

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. Erich Müller)

Untersuchungen über Esterase-Aktivität der Gefäßintima im Bereiche arteriosklerotischer Herde

Von

ERICH MÜLLER und WALTER NEUMANN*

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Juni 1959)



Die Bedeutung des Eiweißfaktors bei der Insudation von Plasma in die arteriosklerotisch erkrankende Gefäßwand — seine Bedeutung vor allem hinsichtlich der Intimaverquellung, der Hyalinose und der fibrösen Herdentwicklung — hat in der *morphologischen* Analyse des Problems „Arteriosklerose“ den Lipidfaktor etwas in den Hintergrund treten lassen. Das steht im Gegensatz zu *klinischen* Untersuchungen, welche die Hyperlipämie und das Auftreten gewisser Lipoproteide im Serum arteriosklerotisch Erkrankter ätiologisch in besonderem Maße herausgestellt haben. Es sei hier nicht auf die Begründungen und die Gegen Gründe der Auffassung eingegangen, welche die Arteriosklerose als eine wesentlich von übergeordneten Störungen des Lipidstoffwechsels bestimmte Krankheit sieht (s. SCHETTLER).

Fett- und Lipoidablagerungen in der Gefäßwand basieren im wesentlichen auf zwei Möglichkeiten: einmal auf erhöhter Anflutung oder Aufstauung und nachfolgender Entkoppelung von Eiweiß-Lipid-Symplexen, zum anderen auf dem Prinzip der Phanerose bei eingeschränkter Zelleistung — wobei die Hyalinbildung als katabiotischer Vorgang an den Fasersubstanzen im Vordergrund steht — und bei Gewebsuntergang im Gefolge einer Hypoxydose. Die Überschreitung der Grenzschichtdicke polsterartig wachsender Intima-herde führt zweifellos zu einer zunehmenden hypoxydotischen Strukturschädigung in der Tiefe der Intima (LINZBACH, W. W. MEYER, E. MÜLLER, W. ROTTER) und damit zur pathogenetischen Möglichkeit der Lipidanreicherung im Sinne der Lipid-Phanerose. Diese ist nach der Erfahrung an Fasern und Grundsubstanzen anderer Gewebe aber von geringerem Ausmaße. Es muß weiter betont werden, daß relativ große faserdichte Herde mit Überschreitung ihrer Grenzschichtdicke entsprechende zu erwartende Lipidansammlungen nicht aufzuweisen brauchen.

Es wird verschiedentlich vermerkt, daß in der Frühphase der Arteriosklerose der Gehalt des arteriosklerotischen Herdes an histologisch nachweis-

baren Lipiden oft überraschend gering ist (BREDT, HOLLE, ROTTER, W. W. MEYER). Das überrascht, da mit verstärkter, besonders hyperlipämischer Plasmaphorese und entsprechendem Säftestau in der Intima sowohl Blutproteine als auch an sie gekoppelte Lipoidmoleküle vermehrt vorhanden sein müssen (die Bildung von Lipoproteiden — Koppelung von Cholesterin, Phosphorlipoiden und Glyceriden an Bluteiweiß — ermöglicht die Bindung sehr vieler Lipoidmoleküle an wenige Proteinmoleküle, FREDRICKSON). Das spätere Auftreten von Lipiden im Skleroseherd wird mit einer zunehmenden Dehydratation der als Hyalin in der Intima abgelagerten Lipoid-Eiweißsymplexe erklärt, die zur Trennung von Eiweiß und Lipoiden führe. Es liegt allerdings in der Lipoproteidbildung eine sicherlich sehr instabile Transportformation vor, deren Entkoppelung schneller und schon in frühen Phasen des arteriosklerotischen Prozesses zu erwarten wäre.

Die Frage nach der Diskrepanz zwischen den Erwartungen und dem negativen oder schwachen Ausfall färberischer Lipidnachweise besonders in frühen Arteriosklerosestadien wirft das Problem fermentchemischer Wirksamkeiten in der Gefäßintima auf. Hier lag die Frage nach der Esteraseaktivität der Gefäßwand nahe. Sie drängt sich aus der Überlegung auf, daß experimentelle Fütterungslipidosen der Gefäßwand rückbildungsfähig sind und daß auch bei der Aortenlipidose des Kleinkindes ihre Reversibilität gegeben ist. Kernpunkt unserer Fragestellung war, ob die Intimazellen mit für Lipidumsetzungen spezifischen Esterasen ausgestattet sind und ob eine Steigerung oder Abschwächung der Fermentaktivität im Verlaufe arteriosklerotischer Veränderungen nachweisbar ist.

Methodik

Wir sind in unseren ersten Untersuchungen zum Nachweis von Esterasen in der Aortenintima nach der von GOMORI angegebenen und von RICHTERICH modifizierten Methode vorgegangen. Dabei wird als Substrat „Tween 60“ verwendet; die durch die Esterasen freigesetzten Fettsäure-Moleküle werden durch Ca-Ionen gebunden und mittels Bleinitrat-Lösung in Bleiseifen übergeführt, das Blei wird durch anschließende Behandlung der Schnitte mit Ammoniumsulfid-Lösung als Bleisulfid sichtbar gemacht (s. LIPP).

Es wurden sowohl Paraffin- als auch Nativ-Gefrierschnitte von Aorten des Obduktionsgutes inkubiert. Während in der gleichen Substratlösung befindliche Kontrollschnitte parenchymatöser Organe (Leber, Niere) in jedem Falle die Reaktion zeigten, ließen sich mit dieser Methode an den Gefäß-Schnitten im Vergleich mit Kontroll-Versuchen (Schnitte 10 min auf 98° C erhitzt, Weglassung des Substrates) keine verwertbaren Ergebnisse erzielen.

Um nach diesen negativen Ergebnissen überhaupt einen Einblick hinsichtlich der Möglichkeit und der Größenordnung einer Esterase-Aktivität in der Gefäßwand im Vergleich mit parenchymatösen Organen zu bekommen, haben wir Reagenzglas-Versuche angestellt. Nach der Methode von E. KNAFFL-LENZ zur Bestimmung von Lipasen wurden (um halbwegs quantitative Aussagen machen zu können) gewichtsmäßig gleiche Mengen (2 g) Leber, Niere, gesunder und arteriosklerotisch veränderter Aorta mit Quarzsand fein zerrieben und mit Glycerin extrahiert. Als Substrat wurde Tributyrin und im Vergleich dazu „Tween 60“ verwendet. Die Menge der fermentativ freigesetzten Fettsäuren wird durch Titration mit n/10 NaOH bis zur Ausgangsfarbeinstellung des zugesetzten Indikators (Neutralrot) ermittelt.

Wie die Abb. 1 zeigt, wird Tributyrin erheblich schneller gespalten als Tween 60 (was wohl mit der Kettenlänge der Fettsäure zusammenhängt);

andererseits spaltet der Leberextrakt das ihm angebotene Substrat etwa 10mal, der Nierenextrakt etwa 5mal schneller als der Aortenextrakt. Obwohl diese Methode hinsichtlich der Lokalisation des Fermentes im Gewebe keinerlei Schlüsse zuläßt und sozusagen lediglich das Integral der Fermentaktivität des verarbeiteten Gewebsstückes widerspiegelt, ohne esterarmen bzw. -reichen Abschnitte darzustellen, lassen

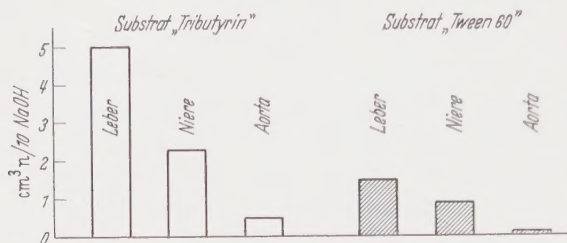


Abb. 1. Esteraseaktivität von Leber-, Nieren- und Aortenextrakt, gemessen an der für die Titration verbrauchten $n/10$ NaOH. Substrat „Tributyrin“ bzw. „Tween 60“ (Indicator Neutralrot). Bebrütungszeit 4 Std. bei 37° C

die damit gewonnenen Aussagen immerhin vermuten, daß die Gomori-Methode nicht die notwendige Empfindlichkeit erreicht, um in der Gefäßwand Esterasen nachzuweisen.

Waren die ersten orientierenden Untersuchungen mit der Gomori-Methode auch

negativ verlaufen, so zeigten die Reagenzglas-Untersuchungen doch eine Esteraseaktivität in der Aortenwand an. Es wurden daher mit Hilfe der Azofarbstoffmethode (GOMORI, PEARSE, SELIGMAN, GÖSSNER) weitere Versuche an Gewebsschnitten unveränderter und arteriosklerotisch veränderter Gefäßwandsstellen vorgenommen.

Zum Methodischen des Esterase-Nachweises mit Hilfe der Azofarbstoffmethode kurz Folgendes: Substrat: α -Naphthylacetat; zur Kupplung mit dem durch Esterasen freigesetzten α -Naphthol wurde als Diazoniumsalz Echtblausalz BB verwendet¹. Material: Dünne etwa 3 mm dicke Gewebsscheiben in 4%igem neutralem Formalin bei 5° C 12–24 Std. fixieren. Gründlich wässern und gefrierschneiden.

Inkubationslösung: Es wird in einem 0,1 M-Phosphatpuffer (pH annähernd gleich 8,0) das α -Naphthylacetat in einer Konzentration von 25 mg-% gelöst (mäßig erwärmen). Nach Abkühlen wird das Diazoniumsalz zugesetzt und zwar so viel, daß eine Konzentration von etwa 200 mg-% vorliegt. Diese Inkubationslösung wird filtriert und in die Inkubationscuvette gegeben. Die Schnitte werden aus destilliertem Wasser heraus in die fertige Inkubationslösung eingelegt. Bebrütung etwa 15–20 min bei 30° C. Anschließend werden die Schnitte in destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen, damit an den Schnitten kein freies Diazoniumsalz haftet. Aus dem destillierten Wasser heraus werden die Schnitte aufgezogen und sogleich mit Eiweiß-Gelatine eingedeckt. Ausfall der positiven Reaktion: feine, körnige, schwärzliche Niederschlagsbildung an den Stellen der Esterase-Aktivität.

Folgende Kontrollen wurden durchgeführt: Jeweils benachbarte Schnitte wurden a) in substratfreier (α -Naphthylacetat-freier) Inkubationslösung bebrütet, hierbei zeigte sich nur die gelbe Eigenfarbe des Diazoniumsalzes im Schnitt, und b) im Wasserbad 10 min einer Temperatur von 98° C ausgesetzt, um die Fermente zu inaktivieren, und im Anschluß daran inkubiert und bebrütet; die so behandelten Schnitte ließen die Reaktion ebenfalls vermissen.

Ergebnisse

Es wurden aus jeweils einem arteriosklerotisch-veränderten Aortenband oder Coronargefäß möglichst Herde verschiedenen Aussehens und verschiedener

¹ Das Diazoniumsalz wurde uns freundlicherweise von den Farbwerken Hoechst, Werk Naphthol-Chemie Offenbach, zur Verfügung gestellt.

Größenordnung ausgewählt und in der Regel in zur Gefäßrichtung längs verlaufenden Schnitten untersucht. Das ließ eine relative ätiologische Einheit verschiedener Entwicklungsstufen und Herdformen bei dem Einzelfall und zugleich eine Vergleichsmöglichkeit einzelner Arteriosklerosefälle untereinander erwarten. Die Frage der zu diskutierenden Früh- oder Spätphase eines arteriosklerotischen Herdes ist eine Frage der *Größenordnung* und des *strukturellen Aufbaues* (die zeitliche Entwicklung ist etwa angedeutet: initiale Aufquellung → Hyalinose → Lipoidose → Atheromatose → Verkalkung → geschwürriger Aufbruch). Beide Faktoren erlauben in großen Zügen eine Unterscheidung zwischen frischeren und älteren Herden.

Über die *histologisch-fermentchemischen Befunde* kann kurz zusammengefaßt berichtet werden. Jeweils benachbarte Schnitte eines Herdes wurden mit Hämatoxylin-Eosin, Hämatoxylin-Sudan und mit der Methode des Fermentnachweises behandelt.

Das Fermentbild der *gesunden Intima* zeigt keine wesentlich nachweisbare Fermentaktivität. Lediglich an Kernen der Intimazellen läßt sich mitunter eine leichte feinkörnige Schwärzung nachweisen, die einem schwach positiven Ergebnis entspricht. In diesem Zusammenhang ist eine Mitteilung von LANG von Interesse, nach der im Pankreas eine hohe Lipase-Aktivität im Kern der Zellen, im Gegensatz zum Cytoplasma, zu finden ist (Nachweistest: Spaltung von Phenolphthaleindibutyrate). Ein besonderes Schwanken dieser Kernaktivität in den verschiedenen Lebensstufen konnte bei Stichproben nicht nachgewiesen werden.

Das Fermentbild der *Frühherde* zeigt eine überraschende Identität der HE-, Sudan- und Fermentschnitte. Die intracelluläre Ablagerung feiner bis grober Fetttröpfchen, die im Sudan-schnitt eine intensive rötliche Färbung zeigen, ergibt eine weitgehend mit der intracellulären Fettablagerung übereinstimmende feinkörnige Niederschlagsbildung bei Durchführung der Fermentreaktion. Dies ist besonders eindrucksvoll in den ganz schwach angedeuteten aufgelockerten ödematösen Herdbildungen, die noch keine nennenswerte Verdickung der Intima hervorgerufen. Hier ist in den aufgelockerten subendothelialen Schichten oft nur eine umschriebene feintropfige, mitunter aber auch ausgesprochen grobtropfige Lipidspeicherung erkennbar, die ein starkes Bild der Fermentreaktion zeigt (Abb. 2). In Herden nächster



Abb. 2. Frische „Insudationszone“ der Aortenintima mit massiver fermentpositiver Schwärzung fettspeichernder Intimazellen; leichte Anschwärzung der Kerne nichtspeichernder Zellen

gelockerten subendothelialen Schichten oft nur eine umschriebene feintropfige, mitunter aber auch ausgesprochen grobtropfige Lipidspeicherung erkennbar, die ein starkes Bild der Fermentreaktion zeigt (Abb. 2). In Herden nächster

Größenordnung heben sich die lipidreichen Zonen oft scharf gegen breitere Zonen kollagener Faservermehrung ab. In Richtung des Faserverlaufes sind oft äußerst feindisperse staubähnliche Lipidablagerungen zu erkennen, ohne

daß es hier zu nennenswerten positiven Fermentreaktionen kommt (Abb. 3). In diesem Zusammenhang sei die Angabe von LANG erwähnt, daß Kollagen, zumal bei älteren Menschen, praktisch stoffwechselinert ist, wenngleich die Stoffwechselleistung nicht allein vom Enzymgehalt begrenzt ist.

In *fortgeschrittenen Herden* zeigt sich ein geringerer oder ausgedehnterer Fermentnachweis, entsprechend einem mehr oder weniger reichlichen Lipidvorkommen in Zellen. Der Fermentnachweis ist eindeutig an aktive intakte Zellen gebunden: hyaline Zonen, fibrös-kollagene Strukturen und vor allem Nekrosezonen ergeben keinen Esterasenachweis auch bei Gegenwart von Lipiden (Abb. 4). Kommt es von den Randzonen oder aus dem Bereiche der Media her zu organisatorischen Gefäßein-



Abb. 3. Stark positiver Esterasenachweis in der lipidreichen Oberflächenzone, leichtere Esteraseaktivität in medianahen Intimazellen, esterasefreie kollagene Mittelzone (Aortenherd)



a



b

Abb. 4 a u. b. Lipidreiche fibröse, in Nekrose übergehende Zonen eines größeren Coronarherdes (a) mit Esterasefreiheit der Faserbereiche und des durch Cholesterinnadelausfall gekennzeichneten Nekrosebereiches (b)

sprossungen und in deren Bereich zu Resorptionszonen, unter Umständen mit Schaumzellbildung, dann lassen sich hier eindeutige intracelluläre Fermentreaktionen nachweisen (Abb. 5). Sie sind auch im Mediabereich solcher resorptiv-organisatorischen Vorgänge nachweisbar.

Ein besonderes Verhalten zeigen diffuse sehr feintropfige staubähnliche Faserinfiltrationen mit Lipiden, welche in der HE-Färbung eine ausgesprochen blaue Anfärbung ergeben, so daß sie an feinkörnige Kalkniederschläge erinnern; im Sudanschnitt zeichnen sie sich durch schwache meist schmutzig bräunliche Anfärbung aus. Zonen dieser Art können als Einzelercheinungen schon in kleineren Herden auftreten, oft sind sie Teilzonen — randständig oder zentral gelegen — größerer Lipoidansammlungen, die in tropfiger intracellulärer Ablagerung oder auch in Form von Cholesterinnadelbildung oder in atherombreiartigem Auftreten an solche Herde angrenzen oder sie umgeben. Der Htx-blau angetönte Bereich zeigt keine Fermentreaktionen, obgleich er meist Kernfärbbarkeit aufweist (Abb. 6). Dieses steht im Gegensatz zu den gewöhnlichen Zonen extracellulärer Lipoidablagerung, in deren Bereich lebend gebliebene Gewebsstrukturen durchaus intracelluläre Speicherung wie auch positive zellgebundene Fermentreaktion ergeben. Bei Einzelherden dieser Art, in deren Randbereichen keine weitere Lipidablagerung feststellbar ist, oder die nur Teilbereiche eines Atheromherdes sind, läßt sich eine Fermentreaktion auch in der Umgebung vermissen.

Von der Intimaoberfläche außerhalb arteriosklerotischer Herde haben wir verschiedentlich Häutchenpräparate angefertigt. Sie zeigen sowohl eine Lipidansammlung in den Oberflächenzellen wie auch deutlich positive Esterase-Reaktionen (Abb. 7). Es liegt hier offensichtlich ein aktiver Permeationsvorgang vor, dessen Bedeutung für die Entwicklung arteriosklerotischer Frühveränderungen allerdings nicht ersichtlich ist.

Besprechung der Ergebnisse

Die Prüfung der Esteraseaktivität der Gefäßwand ergibt, wie im Vorhergehenden dargelegt ist, unterschiedliche quantitative Ergebnisse in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode (daß auch postmortale Veränderungen die Menge der histochemisch nachweisbaren Esterasen vermindern, ist in Rechnung zu stellen, aber im Ausmaß nicht abzuschätzen). Es zeigte sich, daß mit der

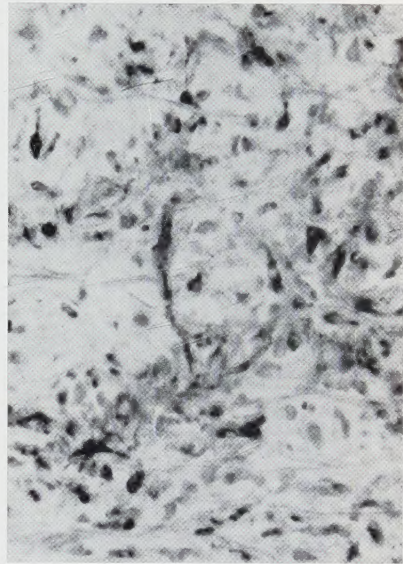


Abb. 5. Medianahe Organisationszone im Randgebiet estersäsefreier Atherombreimassen mit esterasepositiven Zellen

Azofarbstoffmethode gute Ergebnisse zu erzielen sind. Es fiel dabei auf, daß der Esterasenachweis nur an fettspeichernden Zellen zu führen war, und zwar mit merklicher Übereinstimmung, so daß Sudan- und Fermentschnitte sich oft

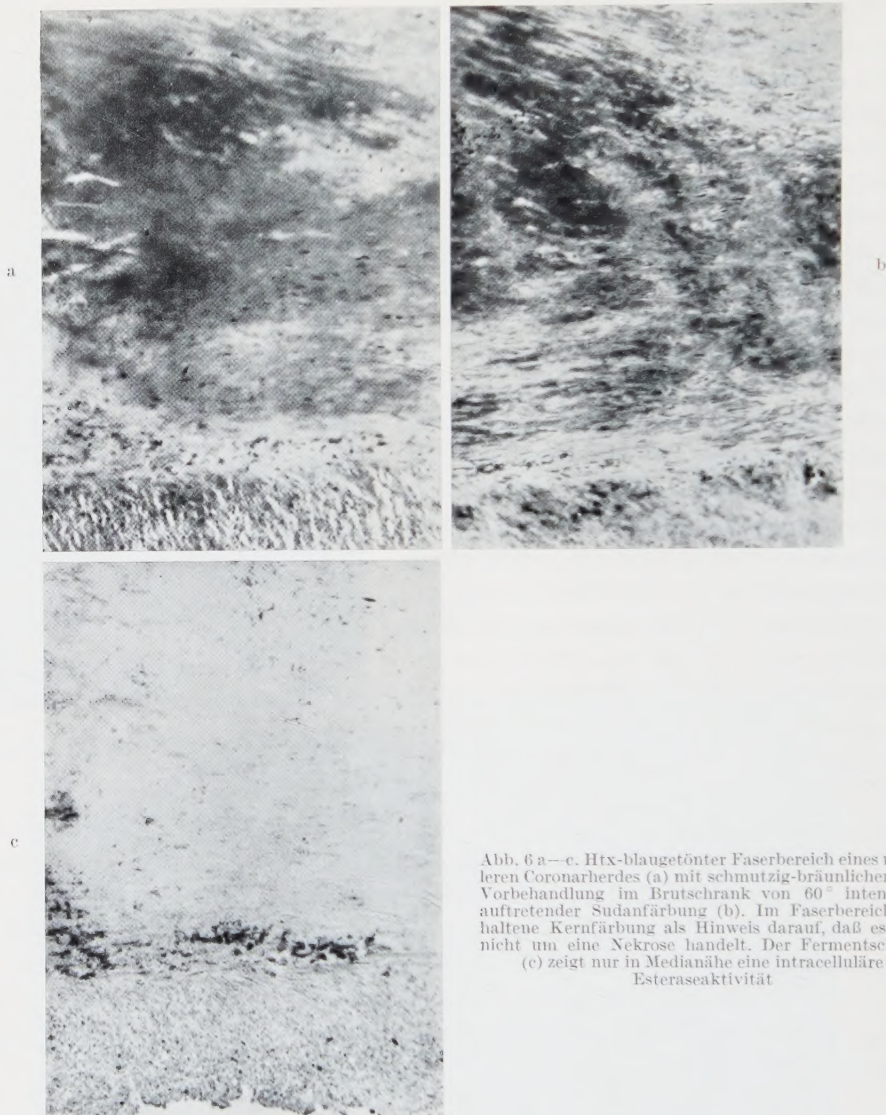


Abb. 6 a—c. Htx-blaugetönter Faserbereich eines mittleren Coronarherdes (a) mit schmutzig-bräunlicher, bei Vorbehandlung im Brutschrank von 60° intensiver auftretender Sudanfärbung (b). Im Faserbereich erhaltene Kernfärbung als Hinweis darauf, daß es sich nicht um eine Nekrose handelt. Der Fermentschnitt (c) zeigt nur in Medianähe eine intracelluläre Esteraseaktivität

weitgehend deckten. Gegen den Einwand, daß es sich also um eine „modifizierte Fettfärbung“ handeln könne, sind aber folgende Untersuchungen und Überlegungen ins Feld zu führen.

Sicher ist die Schwärzung nicht dadurch bedingt, daß das Diazoniumsalz von sich aus mit den Fettsubstanzen unter Bildung eines schwarzen Farb-

stoffes zur Kupplung gelangt, was durch die Inkubation von lipidhaltigen Schnitten unter Weglassung des Substrates (α -Naphthylacetat) zu beweisen ist. Die so behandelten Schnitte zeigen nämlich nur die gelbe Eigenfarbe des verwendeten Diazoniumsalzes. Hier liegt auch das wesentliche Argument: der schwarze

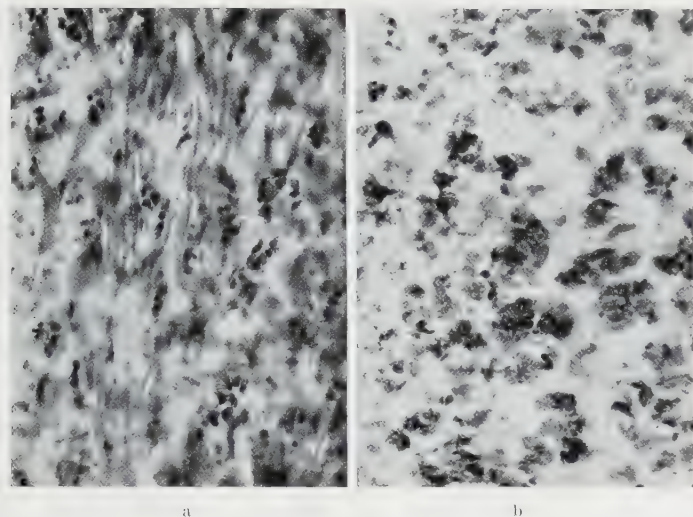


Abb. 7 a u. b. Häutchenpräparate der Intimaoberfläche mit Sudan-positiven Zellen (a) und esterase-positiver Reaktion (b)

Farbstoff kann unter den gegebenen Bedingungen nur dann entstehen, wenn freies α -Naphthol vorhanden ist. Dieses setzt aber in der angewandten Untersuchungsmethode die Tätigkeit eines Fermentes voraus, was zusätzlich durch den negativen Ausfall der Reaktion bei Hitzeinaktivierung bestätigt wird. Ohne Zweifel hydrolysiert α -Naphthylacetat auch spontan, jedoch nicht mit ins Gewicht fallender Geschwindigkeit: eine nennenswerte Spontanhydrolyse müßte zudem an einer schnell auftretenden Trübung der Lösung während der Inkubation festzustellen sein. Es bliebe dann ferner unklar, warum der unlösliche Farbstoff ausgerechnet nur an intracelluläre Fettsubstanzen angelagert wird und nicht überall als Spontanprodukt am Ort der Entstehung sich niederschlägt. Bei den gegebenen Untersuchungsbedingungen kann demnach, zumal unter Berücksichtigung der strengen Lokalisation, nur eine fermentative Wirkung vorliegen. Für sie spricht nicht zuletzt der histologische Befund, daß der positive Ausfall der Reaktion immer an aktiv speichernde, d. h. lebende Zellen gebunden ist. Nekrosezonen zeigten selbst bei erheblichen Verfettungserscheinungen einen negativen Ausfall der Reaktion, die in den lebenden Grenzbereichen des gleichen Schnittes in den Fett-resorbierenden Zellen stark positiv ist. Wir haben darüber hinaus die α -Naphthylacetat-Diazoniumsalz-Reaktion auch an Nierengewebschnitten durchgeführt. Hier zeigen die Tubulus-Epithelien den gleichen positiven Ausfall — also einen positiven Esterasenachweis —

ohne daß die Sudanfärbung Fettablagerungen nachwies. Die Art des Farbniederschlages ist hier die gleiche, also nicht durch intracelluläre tropfige Fettablagerung bedingt.

Will man aus den Untersuchungsergebnissen Schlüsse ziehen, so ist zunächst zu prüfen, ob die im histologischen Schnitt nachgewiesenen Esterasen auch im normalen Fettstoffwechsel eine Rolle spielen. Im Substrat „Tween 60“ handelt es sich noch um eine Esterbindung, wie sie in der Regel in den physiologischen Lipiden vorliegt: ein Alkohol ist mit einer Fettsäure verestert, wenn auch dieser Alkohol im normalen Stoffwechsel nicht vorkommt. Beim α -Naphthylacetat aber liegt die Veresterung einer phenolischen Hydroxyl-Gruppe vor, die sich in ihren chemischen Eigenschaften von denen der alkoholischen erheblich unterscheidet. Der Unterschied zeigt sich bei Betrachtung der Strukturformeln der beiden Bindungen darin, daß das im Falle des α -Naphthols im Ring stehende C-Atom, an welches der Hydroxylsauerstoff gebunden ist, eine Doppelbindung aufweist, wodurch der saure Charakter der phenolischen Hydroxylgruppe bedingt wird. Im Falle des Alkohols (Tween 60) ist das analoge C-Atom ausschließlich durch Einfachbindungen abgesättigt: die Hydroxylgruppe ist neutral.



Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß sich die zur Diskussion stehenden Esterasen durch eine bemerkenswerte Substrat-Unspezifität (GOESSNER) auszeichnen; man kann daher auf Grund der Untersuchungsergebnisse annehmen, daß es die normalen Esterasen sind, die den Naphtholester angreifen. Vergleicht man zudem an Nieren-Schnitten, bei denen sich nach beiden Methoden Esterasen nachweisen lassen, die erhaltenen Bilder, so lassen sich greifbare Abweichungen nicht feststellen und es liegt optisch lediglich ein Unterschied in der Stärke der Reaktion vor. Offensichtlich ist die Spezifität der Esterasen mehr auf die Fettsäure als auf die andere Komponente des Esters ausgerichtet. Es wurde bereits betont, daß die Fermentreaktion gleichzeitig mit dem Auftreten von Sudan-positiven Substanzen in der Zelle positiv wird; daraus kann man den Schluß ziehen, daß die angewandte Methode in den Zellen Fermente erfaßt, die mit der Umsetzung dieser mittels Sudanfärbung nachgewiesenen Substanzen in Beziehung stehen.

Es liegt die Frage nahe, wie sich die Esterase-Befunde in das Entwicklungsbild der Arteriosklerose einordnen. Farbstoffinjektionen zeigen an der Aorta einen von der Intima zur Adventitia gerichteten Flüssigkeitsstrom, der in abführende Lymphbahnen und Vasa vasorum führt. Es ist sicher, daß auch

Lipoid-Eiweiß-Symplexe oder Lipide aus dem Strukturabbau ischämisch geschädigter Gefäßwandzonen diesen Bahnen der Gewebsflüssigkeit folgen und daß ihre Anhäufung nicht nur mit der Haftung an veränderter Grundsubstanz, sondern auch mit der Erschwerung oder Blockade des Abstromes zusammenhängen kann. Das Problem der Bewältigung solcher Lipide — in gleicher Weise natürlich auch von Eiweißkolloiden, Glucoproteiden, Elektrolyten — durch die noch vitalen Zellbereiche der Intima entscheidet über Ausbleiben, Reversibilität oder Entwicklung von Veränderungen, die das Bild der Arteriosklerose einleiten und weiterformend bestimmen.

Es stehen dem Organismus zwei Wege einer Bewältigung von Lipidansammlungen zur Verfügung: die einfache fermentative Spaltung in ortsständigen Zellen und die Bildung eines mesenchymalen Resorptionsgewebes in Richtung der Organisation. Wenn auch der Versuch der Bildung eines Resorptions- und Organisationsgewebes mitunter bei atheromatösen Herden nachweisbar ist, so spielen sich diese Vorgänge aber nur „am Rande“ ab und haben bei den lipidreichen Arteriosklerosen der großen Gefäße keine entscheidende Bedeutung. Es zeigt sich vielmehr in der Regel, daß große Lipidmassen depotartig reaktionsfrei in der Gefäßwand liegen, wobei sich Analogien zum Peritonealtest inerte Staubmassen ergeben. Beim inerten Staub ist die Depotbildung ein Vorgang, der eine größere Zusammenballung offenbar unangreifbaren Materials bindegewebig umschalend abgrenzt, ohne daß reaktive Vorgänge auftreten (OTTO u. EHRHARDT, E. MÜLLER u. EHRHARDT). Die Aggregation größerer Lipidmassen in Arterioskleroseherden erfährt zwar keine besondere bindegewebige Abgrenzung, aber die mesenchymale Reaktionsschwäche ist ähnlich bezeichnend für die Unfähigkeit einer resorptiven Bewältigung von atheromatösen Herden.

Mit dieser Tatsache rückt die *direkte* fermentative Bewältigung aufgestauter Lipide — die im wesentlichen als Cholesterinester vorliegen — entscheidend in den Vordergrund. Hier tritt in der Beurteilung der Esteraseaktivität allerdings die Schwierigkeit auf, festzustellen, welcher Art die Umsetzung ist, die sie im arteriosklerotischen Herd vollzieht. Esterasen bewirken in der Regel lediglich eine beschleunigte Einstellung des für die jeweilige Reaktion charakteristischen Gleichgewichtes. Aus diesem Grunde ist nicht ohne weiteres zu sagen, in welcher Richtung die zur Diskussion stehenden Esterasen den Ablauf des Geschehens bei der Gefäßwandlipoidose beeinflussen. SCHWERD fand bei Seifenabort in der Wand der Uterusgefäße feine Ablagerungen von Neutralfett, in welchen sich Fettsäuren gleicher Struktur wie in der verwendeten Seife nachweisen ließen. Er vermutete eine Synthese dieser Neutralfette aus Glycerin des Organismus und den Fettsäuren der Seifenlösung durch eine Gefäßwandlipase.

Die Esterase-Aktivität der Intima nimmt offensichtlich im Maße der intracellulären Lipidablagerungen zu. Daß hierbei eine Neubildung von Enzymen erfolgt, ist nach dem histochemischen Erscheinungs- und Entwicklungsbild der einzelnen Arteriosklerosephasen anzunehmen (eine adaptive Neubildung von

Enzymen ist nach LANG erwiesen). Der Fermentnachweis allein läßt keinen Rückschluß zu, ob intravital jeweils eine synthetische oder eine hydrolytische Tätigkeit überwiegt. Es kann lediglich auf Grund des Massenangebotes von leicht resorbierbaren Cholesterinestern im Arteriosklerosherd eine vorwiegend spaltende Tätigkeit der Esterasen bei zunehmender Lipidresorption in die sonst fettfreien Intimazellen vermutet werden.

Einige Besonderheiten der Esterasereaktion seien herausgestellt. Trotz reichlichem Lipidvorkommen sind neben Nekrosenherden auch hyalin kollagene Bereiche in Arteriosklerosherden oft esterasefrei. Daß Nekrosenzone keine Fermentaktivität zeigen, bedarf keiner Begründung. Von Bedeutung für den Entwicklungsgang der Arteriosklerose kann der negative Ausfall der Esterasereaktion in Zonen breiter Faserentwicklung mit starker Kollagen- und Hyalinbildung werden, soweit sie eine meist diffuse staubähnliche Verfettung der Grundsubstanzstrukturen zeigen. Verfettungen dieser Art sind möglicherweise beim Hyalin adsorptive Bindungen freigesetzter Lipide insudierten Blutplasmas, im wesentlichen sind sie aber als katabiotische Dystrophien der Faserbereiche zu werten. Der Kollagenisierungs- und Hyalinisierungsvorgang der Intima verstärkt nicht nur die allgemeine Bradytrophie des Gewebes durch Verdichtung der Strukturen, er führt auch zu einer Schwächung der Zellaktivität, welche sich in der Unfähigkeit zu adaptiver Esterasebildung äußert. Hierauf gründet die mangelhafte Umsetzung der Faserlipide in solchen Zonen. Lipidanlagerungen an die Grundsubstanz können in dieser Form als Schlackenstoffe die Fasererweichung, die Nekrose und die Atherombildung fördern.

Eine zweite Besonderheit ist zu vermerken. Große Strecken feiner Lipid-Faserimprägnation, die sich in solchen Fällen durch bläuliche Anfärbung mit Hämatoxylin anzeigen, sind nach HOLLE und nach Untersuchungen mit LAGARIE durch staubförmige Ablagerungen von Fetten höherer Schmelzpunkte charakterisiert. Sie zeigen stets eine negative Esterasereaktion (s. Abb. 6a—c). Hier kann die Ursache fermentativer Insuffizienz in einer mangelnden fermentativen Angriffsmöglichkeit bestehen, indem Substrate vorliegen, die für die Esterasen der Intima keinen Reaktionspartner darstellen. Es kommt nicht zur Bildung eines Ferment-Substratkomplexes. Infolgedessen ist auch die Möglichkeit einer adaptiven Fermentbildung und damit einer fermentativen Umsetzung dieser Lipide nicht gegeben. Ablagerungsbereiche solcher nicht umsetzbaren, färberisch durch Htx-Anfärbung gekennzeichneten Lipide lassen oft den Übergang in nekrobiotische Gewebsschäden erkennen, welche die Grundlage atheromatöser Herde bilden.

Auf ein Letztes sei kurz hingewiesen. In den Lipiden sind z. T. hydrophobe, sehr schlecht wasserlösliche Körper an der Fermentreaktion beteiligt, die bei der Arteriosklerose in zunehmendem Maße — begünstigt durch Dehydratation hyaliner Eiweiße in der Gefäßwand — ausgefällt werden und sich dadurch der unmittelbaren Umsetzung entziehen. Das kann zusätzlich die fortschreitende „Insuffizienz“ der Esterasebildung bei Entmischung der Lipide zu cholesterin-

reichen Atheromherden bedingen, eine Insuffizienz der Verarbeitung, die andererseits auch in der Bildung von Schaumzellen im Herdbereich sich manifestieren kann, welche zwar cholesterinesterreiche Lipide aufnehmen, diese aber nicht mehr zu spalten vermögen (LETTERER).

Zusammenfassung

Es wurden fermentchemische Untersuchungen hinsichtlich einer Esterase-Aktivität an arteriosklerotisch veränderten Aorten und Coronararterien angestellt, welche mit der Azofarbstoff-Methode positive Ergebnisse zeigten. Während sich an der gesunden Intima praktisch kein Esterase-Nachweis führen läßt, geben die verschiedensten Phasen arteriosklerotischer Herdentwicklung — parallelgehend einem intracellulären Lipid-Befund — eindeutige esterasepositive Reaktionen. An der Fermentreaktion beteiligen sich, auch außerhalb arteriosklerotischer Herde, die Zellen der Intima-Oberflächenbereiche, wie sich im Häutchenpräparat nachweisen läßt. Die Esterase-Reaktion zeigt sich besonders stark an lipidreichen Intima-Zellen in der frühen Insudationsphase, in gleicher Weise aber auch an lipidbeladenen Zellen älterer Herde.

Eine Esterasetätigkeit bleibt, abgesehen von Nekrosezonen, meistens aus in stark kollagenisierten und hyalinisierten Sklerosebereichen. Eine besondere „Aussparung“ im Bilde der Esterasereaktion zeigen Zonen feiner staubartiger, mit Hämatoxylin meist blau angetönter Lipidablagerungen, in denen Lipide höherer Schmelzpunktwerte vorliegen.

Die dem intracellulären Erscheinen von Lipiden zugeordnete adaptive Bildung von Esterasen läßt auf eine Beziehung zur Umsetzung von Lipiden sowohl in der arteriosklerotischen Frühphase als auch in späteren Phasen schließen, wenn auch die Art der Esterase-Tätigkeit, ob vorwiegend synthetisierend oder hydrolysierend, sich nicht nachweisen läßt.

Literatur

- BREDT, H.: Entzündung und Sklerose der Lungenschlagader. *Virchows Arch. path. Anat.* **308**, 60 (1941). — BREDT, H.: Die Morphologie der Arteriosklerose. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **41**, 11 (1957). — FREDERICKSON, D. S.: Some biochemical aspects of lipid and lipoprotein metabolism. *J. Amer. med. Ass.* **164**, 1895 (1957); ref. in *Mat. Medica Nordmark X*, 11, 318 (1958). — GOESSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. *Z. Zellforsch.* **1**, 48 (1958). — GOMORI, G.: The histochemistry of esterases. *Int. Rev. Cytol.* **1**, 323 (1952). — GOMORI, G.: *Microscopic histochemistry*. University of Chicago Press 1953. — GOMORI, G.: Histochemistry of human esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 479 (1955). — HOLLE, G.: Über Lipoidose, Atheromatose und Sklerose der Aorta und deren Beziehungen zur Endoarteritis. *Virchows Arch. path. Anat.* **310**, 160 (1943). — KNAFFL-LENZ: In BAMANN-MYRBAECK, Die Methoden der Fermentforschung. Leipzig: Georg Thieme 1941. — LAGARIE, G.: Untersuchungen über pseudokalkartige Niederschläge in der Gefäßwand bei Coronarsklerose. *Diss. Würzburg* 1945. — LANGE, K.: Die Biologie der Enzyme. 4. Colloquium d. Ges. Physiol. Chemie, Mosbach 1953. — LETTERER, E.: Allgemeine Pathologie. Stuttgart: G. Thieme 1959. — LINZBACH, A. J.: Vergleiche der dystrophischen Vorgänge an Knorpel und Arterien als Grundlage zum Verständnis der Arteriosklerose. *Virchows Arch. path. Anat.* **311**, 432 (1944). — LIPP, W.: Esterasen. *Histochemische Methoden I*, 15. München: R. Oldenbourg 1954. — MEYER, W. W.:

Die Bedeutung der Eiweißablagerungen in der Histogenese arteriosklerotischer Veränderungen der Aorta. Virchows Arch. path. Anat. **316**, 268 (1949). — MÜLLER, E.: Die tödliche Coronarsklerose bei jüngeren Männern. Beitr. path. Anat. **110**, 103 (1949). — MÜLLER, E., u. W. EHRHARDT: Experimenteller Beitrag zur Frage der Cancerogenität von Eisenoxydstaub. Z. Krebsforsch. **61**, 65 (1956). — OTTO, H., u. W. EHRHARDT: Vergleichende Untersuchungen von Quarz, Glas- und Hüttenwolle und Eisenoxyd im Peritonealtest. Beitr. path. Anat. **116**, 71 (1956). — PEARSE, A. E. G.: Histochemistry, theoretical and applied. London 1953. — RICHTERICH, R.: Enzympathologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958. — ROTTER, W.G.: Allgemeine und spezielle Pathologie der Arterien. Nauheimer Fortbildungs-Lehrg. **23**, 8 (1958). — SCHETTLER, G.: Pathogenese und Ätiologie der Arteriosklerose, die Rolle der Blutfaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose. Verh. dtsch. Ges. Path. **41**, 41 (1957). — SCHWERD, W.: Der gerichtsmedizinische Nachweis des Seifenabortes und der Seifenintoxikation. Hab.-Schrift Med. Fak. Erlangen 1957.

Prof. Dr. ERICH MÜLLER,
Pathologisches Institut der Universität Erlangen

Lebenslauf

Am 9. Januar 1931 wurde ich, Walter Josef Neumann, in Heinersdorf a.T., Kreis Friedland im Isergebirge (Sudetenland) als Sohn der Elisabeth Neumann geboren.

Von 1937 bis 1941 besuchte ich die Volksschule und daran anschließend bis 1945 die Hauptschule meines Geburtsortes. Dann wurde meine Schulbildung infolge der Nachkriegswirren und der Vertreibung aus unserer Heimat unterbrochen.

1948 trat ich in die Lehre als Kraftfahrzeugschlosser und legte im Herbst 1950 für dieses Handwerk die Gesellenprüfung ab.

Von 1950 bis 1952 nahm ich an einem Kurs zur Erlangung der Hochschulreife an der Universität Leipzig teil, daran anschließend besuchte ich noch ein halbes Jahr die Oberrealschule Bamberg; dort legte ich im Juli 1953 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Wintersemester 1953/54 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen mit dem Studium der Medizin, hier legte ich im März 1956 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Studienjahr 1957/58 war ich zwei Semester an der Universität Wien immatrikuliert. Zum Wintersemester 58/59 kam ich zurück an die Universität Erlangen, hier bestand ich am 18.6.1959 die ärztliche Prüfung.

